



FR 00 / 00754

18 AVR. 2000

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 11 AVR. 2000

**DOCUMENT DE PRIORITÉ**  
**PRÉSENTÉ OU TRANSMIS**  
**CONFORMÉMENT À LA**  
**RÈGLE 17.1.a) OU b)**

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cédex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30



**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 33 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

<p>DATE DE REMISE DES PIÈCES <b>21 MAI 1999</b></p> <p>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL <b>99 06679 -</b></p> <p>DÉPARTEMENT DE DÉPÔT <b>STA</b></p> <p>DATE DE DÉPÔT <b>21 MAI 1999</b></p>		<p>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</p> <p style="text-align: center;"><b>CABINET C. M. DE LOYENIE</b> 132, AVENUE 13295 MARSEILLE Cedex 9</p> <p>n° du pouvoir permanent    références du correspondant    téléphone</p> <p style="text-align: center;"><b>H52 337 C2A</b></p>									
<p>2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention    <input type="checkbox"/> demande divisionnaire</p> <p><input type="checkbox"/> certificat d'utilité    <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen</p> <p style="text-align: center;">demande initiale</p> <p>Établissement du rapport de recherche    <input type="checkbox"/> différé    <input checked="" type="checkbox"/> immédiat</p> <p>Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance    <input type="checkbox"/> oui    <input checked="" type="checkbox"/> non</p> <p>Titre de l'invention (200 caractères maximum)</p> <p style="text-align: center;"><b>Diagnostic de la maladie de Whipple</b></p>		<p>3 DEMANDEUR (S)    n° SIREN    code APE-NAF</p> <p>Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination</p> <p style="text-align: center;"><b><u>RAOULT</u> Didier</b></p> <p>Forme juridique</p> <p>Nationalité (s)    <b>FRANCAISE</b></p> <p>Adresse (s) complète (s)</p> <p style="text-align: center;"><b>16, Rue de Lorraine 13008 MARSEILLE</b></p> <p>Pays</p> <p style="text-align: center;"><b>FRANCE</b></p>									
<p>4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs    <input checked="" type="checkbox"/> oui    <input type="checkbox"/> non    Si la réponse est non, fournir une désignation séparée</p> <p>5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES    <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois    <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission</p>											
<p>6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE</p> <table style="width: 100%;"> <tr> <th>pays d'origine</th> <th>numéro</th> <th>date de dépôt</th> <th>nature de la demande</th> </tr> <tr> <td style="text-align: center;"><b>FRANCE</b></td> <td style="text-align: center;"><b>99 / 03989</b></td> <td style="text-align: center;"><b>26 Mars 1999</b></td> <td style="text-align: center;"><b>BREVET D'INVENTION</b></td> </tr> </table>				pays d'origine	numéro	date de dépôt	nature de la demande	<b>FRANCE</b>	<b>99 / 03989</b>	<b>26 Mars 1999</b>	<b>BREVET D'INVENTION</b>
pays d'origine	numéro	date de dépôt	nature de la demande								
<b>FRANCE</b>	<b>99 / 03989</b>	<b>26 Mars 1999</b>	<b>BREVET D'INVENTION</b>								
<p>7 DIVISIONS antérieures à la présente demande    n°    date    n°    date</p>											
<p>8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire - n° d'inscription)</p> <p style="text-align: center;"><b>Paul Héard</b> <b>Paul HERARD</b> <b>(CPI 94-1205)</b></p>		<p>SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION    SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI</p>									



La présente invention concerne le domaine du diagnostic. Plus précisément, l'invention concerne une méthode pour le diagnostic sérologique *in vitro* de la maladie de Whipple ainsi qu'un dispositif pour la mise en oeuvre de cette méthode. L'invention concerne également une trousse pour la détection *in vitro* de la bactérie responsable de la maladie Whipple.

La maladie de Whipple est une maladie qui se présente sous des formes variées. La forme la plus classique est celle d'une fièvre avec une diarrhée chronique qui entraîne un amaigrissement, mais c'est aussi une maladie qui est susceptible de donner des atteintes articulaires chroniques, des atteintes cérébrales avec démence et aussi une atteinte cardiaque en particulier une endocardite à hémoculture négative.

Dès sa description princeps en 1907, Whipple évoque l'existence d'une bactérie associée à la "lipodystrophie intestinale" devant l'observation de nombreux micro-organismes après coloration argentique d'un ganglion mésentérique (Whipple, Bull. John Hopkins Hosp. 1907 ; 18 : 328-391). La mise en évidence du caractère PAS (de l'anglais "periodic acid Schiff") positif non spécifique de cette bactérie, puis les observations en microscopie électronique confirment la présence d'une espèce bactérienne intracellulaire de structure Gram positif (Cheers et al., Gastroenterology 1961 ; 41 : 129-138). L'outil moléculaire universel 16S ARNr a permis de confirmer cette hypothèse en précisant la taxonomie phylogénique de cette nouvelle espèce bactérienne, et en lui assignant le nom provisoire de *Tropheryma whippelii* pour évoquer la notion de malabsorption intestinale et honorer le découvreur de l'affection (Relman et al., N. Engl. J. Med. 1992 ; 327 : 293-301). Le séquençage direct de 721 bases d'un fragment amplifié à partir d'une biopsie de l'intestin grêle d'un patient (Wilson et al., Lancet 1991 ; 338 : 474-475), puis à partir d'un ganglion d'un autre patient (Wilson et al., ASM News 1992 ; 58 : 318-321) confirme l'originalité de l'espèce bactérienne associée à la maladie de Whipple. Le séquençage par Relman et al. (op. cité) de 1 321 bases représentant 90 % du gène sur un échantillon, et un fragment de 284 bases chez quatre autres patients a permis de confirmer que l'espèce bactérienne associée à la maladie de Whipple représentait une espèce nouvelle, de préciser sa position taxonomique dans le phylum des actinomycetes, c'est-à-dire des bactéries de structure Gram positif à haut contenu en guanosine

plus cytosine, représentant un nouvel embranchement relativement proche de deux espèces connues en pathologie humaine, *Actinomyces pyogenes* et *Rothia dentocariosa*.

Le diagnostic de la maladie est actuellement fait par l'observation après coloration de frottis microscopique obtenu de biopsie ou par amplification et séquençage de l'outil du gène universel 16S ARNr (Relman et al., op. cité).

A ce jour en effet, la bactérie responsable de la maladie de Whipple n'a pas pu être isolée et cultivée de manière telle qu'une sérologie puisse être envisagée.

Contre toute attente, le Déposant a mis au point une méthode pour la culture de la bactérie responsable de la maladie de Whipple.

Cette méthode, qui est détaillée dans les sections 1 et 2 ci-après, comprend l'inoculation d'un broyat de valve cardiaque sur des fibroblastes humains de la lignée HEL dans du milieu MEM.

La bactérie responsable de la maladie de Whipple a été isolée et établie en culture après un minimum de deux mois d'incubation, le milieu de culture étant remplacé régulièrement. Par "établie en culture", on entend que la bactérie est obtenue de manière reproductible et se multiplie au cours du temps.

La présente invention est donc relative à la bactérie ainsi isolée et établie en tant que source d'antigène. Cette bactérie a été déposée à la CNCM (Paris-France) le 11 mai 1999 sous le n° de réception 6857.905.

La présente invention est aussi relative à une méthode pour le diagnostic sérologique *in vitro* de la maladie de Whipple, qui comprend la mise en contact du sérum ou de tout autre liquide biologique d'un patient avec la bactérie telle que définie ci-dessus, et la détection de la réaction immunologique.

Avantageusement, la méthode de diagnostic de l'invention met en oeuvre un dosage immunoenzymatique de type ELISA ou un dosage immunofluorescent. Plus particulièrement, la méthode selon l'invention comprend :

- le dépôt dans ou sur un support solide d'une solution de bactérie isolée et établie comme indiqué ci-dessus ;
- l'introduction dans ou sur ledit support du sérum ou du fluide biologique à tester dilué ;

- l'introduction dans ou sur le support d'une solution d'immunoglobuline anti-humaine marquée ;

- l'observation d'une période d'incubation ;

- le rinçage éventuel du support solide ;

5 - la détection proprement dite de la réaction immunologique.

Comme support solide, on peut utiliser tout dispositif adapté à la manipulation de suspensions cellulaires et bactériennes et notamment des tubes, des lames de verre, des tubes Bijoux ou des plaques rigides de microtitrage en polyéthylène, polystyrène, chlorure de polyvinyle ou nitrocellulose comportant des micropuits, les lames de verre étant préférées.

L'anticorps détecté est une immunoglobuline, notamment de type G, M ou A, spécifique de la bactérie responsable de la maladie de Whipple. Comme type de marquage de l'immunoglobuline anti-humaine, on utilise un marquage enzymatique, radioactif ou fluorescent, ce dernier type de marquage étant préféré.

15 L'expression "marquage fluorescent" signifie que l'anticorps a été rendu fluorescent par un agent fluorescent approprié tel que l'iso(thio)cyanate de fluorescéine combinée à une immunoglobine animale reconnaissant l'anticorps humain.

L'expression "marquage radioactif" signifie que l'anticorps porte, soit sur un élément de sa structure, par exemple les résidus de tyrosine constitutifs, soit sur un radical approprié qui lui a été fixé, un isotope radioactif permettant de le doser par comptage de la radioactivité qui lui est associée.

L'expression "marquage enzymatique" signifie que l'anticorps est couplé à une enzyme qui, associée à l'emploi de réactifs appropriés, permet une mesure quantitative de cet anticorps spécifique.

Le substrat et les réactifs sont choisis de sorte que le produit final de la réaction ou de la séquence de réactions provoquée par l'enzyme et mettant en oeuvre ces substances soit :

- ou bien une substance colorée ou fluorescente qui diffuse dans le milieu liquide environnant l'échantillon testé et qui fait l'objet, soit de la mesure finale spectrophotométrique ou fluorimétrique, respectivement, soit d'une évaluation à l'oeil, éventuellement par rapport à une gamme de teintes étalonnées,

- ou bien une substance colorée insoluble qui se dépose sur l'échantillon testé et qui peut faire l'objet, soit d'une mesure photométrique par réflexion, soit d'une évaluation à l'oeil, éventuellement par rapport à une gamme de teintes étalonnées.

5 Lorsque l'on utilise un anticorps rendu fluorescent, la fluorescence associée à l'échantillon testé est lue directement sur un appareil approprié.

Lorsque l'on utilise une sonde radioactive, comme par exemple l'iode 125, la radioactivité associée à l'échantillon testé est comptée dans un compteur gamma selon toute modalité appropriée et par exemple après solubilisation des cellules par  
10 une solution alcaline (par exemple une solution de soude) et récupération de la solution contenant la radioactivité à l'aide d'un tampon absorbant.

Lorsque l'on utilise une enzyme sur l'anticorps spécifique, l'apparition d'un produit coloré ou fluorescent est obtenue en ajoutant une solution contenant le substrat de l'enzyme et un ou plusieurs réactifs auxiliaires permettant d'obtenir  
15 finalement comme produit de réaction, soit un produit coloré soluble dans le milieu, soit un produit coloré insoluble, soit un produit fluorescent soluble, comme cela a été expliqué précédemment. On mesure ensuite le signal lumineux provenant des échantillons ainsi traités, à l'aide de l'appareillage adapté à chaque cas : photomètre en transmission, ou en réflexion ou fluorimètre respectivement. Alternativement, on  
20 peut aussi évaluer à l'oeil la coloration obtenue, en s'aidant éventuellement d'une gamme de solutions colorées étalonnées.

En utilisant comme enzyme la phosphatase alcaline, le couplage de cette enzyme avec l'anticorps spécifique est effectué selon la méthode proposée par Boehringer Mannheim-Biochemica. Les substrats préférentiels de cette enzyme sont  
25 le paranitrophénylphosphate pour une lecture finale spectrophotométrique ou le méthyl-4-umbelliféryl phosphate pour une lecture fluorométrique ou le bromo-5-chloro-4 indolyl-3 phosphate pour obtenir un produit de réaction coloré insoluble. On peut de même utiliser comme enzyme la  $\beta$ -galactosidase dont les substrats préférentiels sont l'orthonitrophényl  $\beta$ -D-galactopyranoside ou le méthyl-4  
30 umbelliféryl  $\beta$ -D-galactopyranoside.

Préférentiellement, on peut coupler les anticorps spécifiques à la peroxydase. Dans ce cas, le procédé de couplage est dérivé de celui décrit par M.B.



WILSON et P.K. NAKANE in Immunofluorescence and Related Staining Techniques, W. Knapp, K. Kolubar, G. Wicks ed. Elsevier/North Holland. Amsterdam 1978, p. 215-224.

Les réactifs utilisés pour révéler la peroxydase conjuguée aux anticorps spécifiques contiennent de l'eau oxygénée, substrat de l'enzyme, et un chromogène approprié par exemple de l'orthophénylènediamine ou l'acide azino-2,2' bis(éthyl-3 thiazoline sulfonique-6) ou ABTS pour obtenir un produit final de réaction coloré et soluble dans le milieu ou bien la diamino-3,3' benzidine ou l'amino-3 éthyl-9 carbazole ou le chloro-4  $\alpha$ -naphtol pour obtenir un produit final de réaction insoluble, ou bien l'acide parahydroxyphényl propionique pour obtenir un produit de réaction fluorescent soluble dans le milieu.

Un autre mode de réalisation de l'invention est l'utilisation d'anticorps spécifiques couplés à l'acétylcholinestérase.

L'acétylcholinestérase est couplée à l'anticorps en utilisant préférentiellement un procédé dérivé de celui décrit dans le brevet français n° 2 550 799 ou un procédé qui comporte schématiquement la préparation de fragments de l'anticorps par une technique connue, la modification de l'enzyme par réaction avec un agent hétérobifonctionnel approprié et enfin le couplage des produits ainsi obtenus. D'autres procédés connus de construction de conjugués immunoenzymatiques peuvent aussi être utilisés dans ce cas.

La révélation de l'activité enzymatique spécifiquement liée à l'antigène reconnu par le conjugué à l'acétylcholinestérase est réalisée de préférence selon la technique bien connue qui emploie l'acétylthiocholine comme substrat de l'enzyme et le réactif d'Ellman, ou acide dithio-5,5' nitro-2 benzoïque comme chromogène, selon toute variante adaptée au cas examiné, par exemple celle décrite par Pradelles et al. dans Anal. Chem. 1985, 57 : 1170-1173.

Les chromogènes cités sont utilisés tels quels ou sous forme de sels solubles dans l'eau.

La méthode de diagnostic sérologique de l'invention est adaptée à une utilisation dans des laboratoires de biologie et/ou d'anatomopathologie. Pour ce faire, on propose un dispositif pour la mise en oeuvre de cette méthode, qui

comprend un support solide sur ou dans lequel on a déposé une solution contenant la bactérie telle que définie précédemment.

L'invention est aussi relative selon un autre aspect à une trousse pour la détection *in vitro* de la bactérie responsable de la maladie de Whipple. Cette trousse comprend comme composants:

- une solution contenant la bactérie responsable de la maladie de Whipple, isolée et établie comme décrit ci-dessus, à titre de témoin positif;
- une solution contenant un anticorps spécifique marqué;
- éventuellement, une solution de lavage.

L'anticorps spécifique utilisé dans la trousse de l'invention est avantageusement marqué par une sonde radioactive, une enzyme ou un agent fluorescent.

Lorsque l'anticorps spécifique est marqué par une enzyme, la trousse comprend en outre le substrat de l'enzyme et un ou plusieurs réactifs pour visualiser l'activité de l'enzyme.

Lorsque l'anticorps spécifique est marqué par un agent fluorescent, on utilise de préférence l'iso(thio)cyanate de fluorescéine.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, on utilise comme anticorps spécifique une immunoglobuline, en particulier une immunoglobuline de souris.

L'invention sera mieux comprise à l'aide de l'exposé ci-après, divisé en sections, qui concernent des expériences effectuées dans le but de réaliser l'invention, et qui sont données à titre purement illustratif.

### **Section 1 : Primoisolement**

Le primoisolement a été réalisé par la technique de centrifugation sur tubes bijoux inoculés avec une lignée de fibroblastes humains HEL disponible auprès de l'ATCC. Les cellules HEL sont cultivées sur du milieu MEM (Gibco) additionné de 10 % de sérum de veau foetal (Gibco) et de 2 mM de L-glutamine (Gibco). Les tubes bijoux (Sterilin-Felthan-England, 3,7 ml) comportant une lamelle support de 12 mm de diamètre sont inoculés avec 1 ml de milieu de culture contenant environ 50 000 cellules et incubés à 37°C pendant 3 jours sous 5 % de CO<sub>2</sub> de façon à obtenir un tapis de cellules confluentes. La valve cardiaque étudiée a été broyée dans du

milieu MEM, et la suspension a été utilisée pour inoculer les 3 tubes bijoux. Ces tubes ont ensuite été centrifugés à 700 g pendant 1 heure à 22°C. Le surnageant a ensuite été retiré, les tapis ont été lavés deux fois par du tampon PBS stérile, puis incubés avec 1 ml de milieu à 37°C sous 5 % de CO<sub>2</sub>. Le suivi des cultures a été réalisé par cytocentrifugation de 100 µl du surnageant des tubes bijoux et coloration de Gimenez. Cette procédure a été répétée à 10, 20 et 30 jours. Au bout de 30 jours le surnageant et le tapis de cellules des tubes bijoux ont été récoltés et repiqués sur un tapis cellulaire confluent dans une boîte de culture de 25 cm<sup>2</sup> (boîte I) avec 15 ml de milieu de culture et incubées à 37°C sous 5 % de CO<sub>2</sub>. Chaque semaine toutes les 6 semaines suivantes (J72), le tapis cellulaire a été examiné à l'aide d'un microscope inversé à la recherche d'un effet cytopathogène et le milieu de culture a été remplacé par du milieu frais. Avant de changer le milieu, 200 µl de surnageant ont été utilisés pour réaliser une cytocentrifugation colorée par une coloration de Gimenez.

Aucun effet cytopathogène n'a été détecté avant le 65<sup>ème</sup> jour. Au 72<sup>ème</sup> jour, l'examen du tapis cellulaire en microscopie inverse a permis de détecter de petites inclusions sombres et irrégulières dans les cellules HEL. Sur la coloration de Gimenez de la cytocentrifugation du surnageant de la boîte I plusieurs bacilles fins ont été détectés, la plupart en localisation intracellulaire où ils apparaissent plus petits que les extracellulaires. Néanmoins, la plupart étaient mal ou non colorés par la coloration de Gimenez et apparaissaient bleu pâle. A la coloration de Gram de nombreux bacilles ont été aussi détectés. La plupart apparaissaient Gram positif mais plusieurs n'étaient que partiellement violet ou apparaissaient Gram négatif. A la coloration de Ziehl ces bacilles ne sont pas acido-alcool résistants. A la coloration par le PAS, les bacilles PAS positif apparaissaient plus nombreux que sur les colorations précédentes. La plupart des longs bacilles fins sont observables en localisation extracellulaire. Les cellules HEL apparaissent remplies de conglomerats PAS positif et de courts et fins bacilles PAS positif.

## **Section 2 : Propagation de l'isolat**

Toute la procédure de propagation a été réalisée sur des cellules HEL cultivées sur du milieu MEM additionné de 10 % de sérum de veau foetal et de 2 mM de L-glutamine et incubées à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>. Au 75<sup>ème</sup> jour 3 ml de

surnageant de la boîte I ont été utilisés pour inoculer 10 tubes bijoux par la méthode  
 décrite précédemment et 2 ml de surnageant ont été utilisés pour inoculer un tapis  
 cellulaire confluent dans une boîte de culture de 25 cm<sup>2</sup> (boîte A) avec 15 ml de  
 milieu. Les cellules de la boîte I ainsi que le reste du surnageant ont été récoltés  
 5 permettant d'obtenir 10 ml de suspension. Cette suspension a ensuite été divisée en  
 5 aliquots de 2 ml. Un des aliquots a été congelé dans de l'azote liquide. Un aliquot  
 a été inoculé sur un tapis cellulaire confluent dans une boîte de culture de 25 cm<sup>2</sup>  
 (boîte B) avec 15 ml de milieu. Les cellules d'un aliquot ont été lysées par 4 cycles  
 de congélation-décongélation utilisant de l'azote liquide et de l'eau chaude (55°C)  
 10 puis inoculées sur un tapis cellulaire confluent dans une boîte de culture de 25 cm<sup>2</sup>  
 (boîte C) avec 15 ml de milieu. Un aliquot a été inoculé dans une boîte de culture  
 sans tapis cellulaire de 25 cm<sup>2</sup> (boîte D) avec 15 ml de milieu. Au 85<sup>ème</sup> jour, le  
 milieu de toutes les boîtes et des tubes bijoux a été remplacé par du milieu frais. Les  
 cellules ont été récoltées et inoculées dans une boîte de culture de 75 cm<sup>2</sup> (boîte  
 15 D2) avec 30 ml de milieu. Avant de changer le milieu, 200 µl de surnageant ont été  
 utilisés pour réaliser une cytocentrifugation colorée par une coloration par le PAS et  
 le reste du surnageant a été congelé en vue d'être utilisé comme antigène pour la  
 sérologie. Au 95<sup>ème</sup> et au 105<sup>ème</sup> jours, le milieu de toutes les boîtes et des tubes  
 bijoux a été changé comme décrit précédemment. Des petites portions de tapis  
 20 cellulaire ont été grattées afin de réaliser des frottis de cellules en vue d'une  
 coloration par le PAS. L'efficacité de la propagation de la souche a été réalisée par  
 une évaluation semi-quantitative. La présence de bacilles PAS positif a été évaluée  
 microscopiquement en utilisant un grossissement X1000 de la façon suivante : 0,  
 absence ; +, présents mais difficiles à trouver ; ++, faciles à trouver mais non  
 25 présents dans tous les champs ; +++, présents dans tous les champs. Ces  
 évaluations ont été réalisées à l'aveugle.

Toutes les méthodes de propagation se sont avérées efficaces puisque  
 toutes ont permis de retrouver l'isolat après 30 jours de sous-culture (Tableau 1).  
 L'évaluation semi-quantitative a permis d'observer que les procédures les plus  
 30 efficaces sont le repiquage en tube bijoux, la sous-culture de surnageant (boîte A),  
 et le repiquage de cellules (boîtes D, D2).

Tableau 1

		Tube bijoux	Boîte A	Boîte B	Boîte C	Boîte D	Boîte D2
Jour 10	Surnageant	+	-	+	-	+	NF
Jour 20	Surnageant	+	-	+	+	NF	-
	Frottis cellulaire	NF	+	+	+	NF	-
Jour 30	Surnageant	+++	+++	++	+	NF	++
	Frottis cellulaire	NF	++	+	+	NF	++

NF : non fait

5

### Section 3 : Détection par immunofluorescence

La détection de bactéries intracellulaires a été réalisée au 105<sup>ème</sup> jour directement dans un tube bijoux par immunofluorescence. Après fixation par l'acétone, le tube a été rincé deux fois au PBS. 100 µl du sérum du patient dilué au 1:50 avec du PBS avec 3 % de lait écrémé en poudre ont été ajoutés et le tube a été incubé en chambre humide à 37°C pendant 30 mn. Après 3 rinçages au PBS le tube a été incubé pendant 30 mn à 37°C avec 100 µl d'immunoglobuline de chèvre anti-humaine marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine (Fluoline H, Biomerieux, Marcy l'Etoile, France) diluée au 1:200 avec du PBS additionné de 0,2 % de bleu d'Evans. Après 3 rinçages au PBS la lamelle a été montée (cellules vers le bas) en glycérine tamponnée (pH 8) et examinée avec un grossissement X400 à l'aide d'un microscope à fluorescence Zeiss et d'un microscope confocal (LEICA DMIRBE) équipé d'un objectif X100 (NA. 1.4) à immersion.

L'examen en immunofluorescence montre que la coloration par le PAS ainsi que les autres colorations sous évaluent l'infection cellulaire. Sur la lamelle après 30 jours de sous-culture toutes les cellules sont remplies par l'antigène bactérien. L'étude en microscopie confocale confirme la localisation intracellulaire de la bactérie. Plusieurs bactéries sont détectées isolément sous formes de fins bacilles ressemblant à ceux observés par la coloration PAS. Néanmoins, la plupart du

matériel immunopositif correspond à de plus grosses inclusions où il est impossible d'individualiser des bactéries. Il n'est pas détecté de matériel immunopositif dans le noyau des cellules.

#### **Section 4 : Microscopie électronique**

5           Au 105<sup>ème</sup> jour, 300 µl d'une solution contenant les cellules récoltées dans la boîte D2 ont été préparés pour l'étude en microscopie électronique. Les cellules ont été fixées dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5 % en tampon cacodylate 0,1 M contenant 0,1 M de sucrose pendant 1 h à 4°C. Les cellules ont été rincées une nuit dans le même tampon puis fixées 1 h à température ambiante dans du  
10   tetraoxyde d'osmium en tampon cacodylate 0,1 M. La déshydratation a été réalisée par rinçages successifs dans des solutions d'éthanol de concentrations croissantes. Les cellules ont ensuite été incluses en blocs d'Epon 812. De fines sections ont ensuite été coupées à partir des blocs à l'aide d'un microtome LKB Ultratome III puis colorées par une solution saturée d'acétate d'uranyle dans le méthanol et une  
15   solution aqueuse de citrate de plomb avant examen sur un microscope électronique Jeol JEM 1200 EX.

          L'étude en microscopie électronique confirme que les inclusions PAS positif et le matériel immunopositif correspondent à des bactéries intactes ou en voie de dégradation. La membrane cytoplasmique de ces bactéries est composée de deux  
20   couches denses aux électrons. La fine paroi bactérienne est parfois recouverte d'une pseudo-membrane externe qui donne un aspect trilamellaire. Des bactéries en cours de division sont observées.

#### **Section 5 : Production d'anticorps polyclonaux par la souris contre la bactérie responsable de la maladie Whipple**

25           Une souris de la souche Balb C a été injectée de façon intrapéritonéale avec 0,5 ml de surnageant contenant 10<sup>4</sup> bactéries responsables de la maladie de Whipple. La souris a été ensuite réinjectée 1, 2 et 3 semaines après avec 0,5 ml de la même suspension. La souris a été saignée 1 semaine après cette dernière inoculation. Le sérum a été testé d'une part contre la bactérie responsable de la  
30   maladie de Whipple en culture et d'autre part sur la valve d'un patient atteint de la maladie de Whipple, une fois par immunofluorescence et une fois par immunoperoxydase. Les anticorps révélateurs étaient des anticorps anti-souris

marqués à la fluorescéine ou marqués à l'immunoperoxydase (fournis par la société Immunotech).

Les bactéries ont pu être visualisées à l'intérieur des cellules La présente demande concerne donc aussi la détection directe de la bactérie responsable de la

5 maladie de Whipple dans les biopsies et les différents prélèvements par exemple : valve cardiaque, biopsie digestive, ou biopsie de tout autre organe suspecté d'être infecté par la bactérie responsable de la maladie de Whipple.

## REVENDICATIONS

- 5 1. Bactérie responsable de la maladie de Whipple isolée et établie en culture.
2. Bactérie selon la revendication 1, qui est obtenue après au moins deux mois d'incubation dans un milieu de culture à base de MEM.
- 10 3. Méthode pour le diagnostic sérologique *in vitro* de la maladie de Whipple, qui comprend les étapes suivantes:
  - le dépôt dans ou sur un support solide de solution contenant la bactérie telle que définie dans la revendication 1 ou 2;
  - l'introduction dans ou sur ledit support du sérum ou du fluide biologique à
  - 15 tester dilué ;
  - l'introduction dans ou sur le support d'une solution d'immunoglobuline anti-humaine marquée ;
  - l'observation d'une période d'incubation ;
  - le rinçage éventuel du support solide ; et
  - 20 - la détection proprement dite de la réaction immunologique.
4. Méthode selon la revendication 3, dans laquelle l'immunoglobuline est marquée par une sonde radioactive, une enzyme ou un agent fluorescent.
- 25 5. Méthode selon la revendication 4, dans laquelle l'agent fluorescent est l'iso(thio)cyanate de fluorescéine.
6. Méthode selon l'une des revendications 3 à 5, dans laquelle on utilise de environ 0,5 à environ 5  $\mu$ l, de préférence environ 1  $\mu$ l, de ladite solution contenant la
- 30 bactérie.



7. Dispositif pour la mise en oeuvre de la méthode selon l'une des revendications 3 à 6, qui comprend un support solide dans ou sur lequel une solution contenant la bactérie a été disposée.
- 5 8. Dispositif selon la revendication 7, dans lequel le support solide est une lamelle de verre.
9. Trousse pour la détection *in vitro* de la bactérie responsable de la maladie de Whipple, comprenant comme composants:
- 10 - une solution contenant la bactérie telle que définie dans la revendication 1 ou 2;  
- une solution contenant un anticorps spécifique marqué;  
- éventuellement, une solution de lavage.
10. Trousse selon la revendication 9 dans laquelle l'anticorps spécifique est  
15 marqué par une sonde radioactive, une enzyme ou un agent fluorescent.
- 11 Trousse selon la revendication 10, dans laquelle l'anticorps spécifique est marqué par une enzyme.
- 20 12. Trousse selon la revendication 11, qui comprend en outre le substrat de l'enzyme et un ou plusieurs réactifs pour visualiser l'activité de l'enzyme.
13. Trousse selon la revendication 10, dans laquelle l'anticorps spécifique est marqué par un agent fluorescent.
- 25 14. Trousse selon la revendication 13, dans laquelle l'agent fluorescent est l'iso(thio)cyanate de fluorescéine.
15. Trousse selon l'une des revendications 9 à 14, dans laquelle l'anticorps  
30 spécifique est une immunoglobuline, de préférence une immunoglobuline de souris.

